THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(mention Sciences)

PAR

Madame Danielle VEISSIÈRE

1re THÈSE

IDENTIFICATION, ISOLEMENT ET STRUCTURE DE LIPOPROTEINES SÉRIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

2e THÈSE

LES PHOSPHOLIPIDES DE LA BILE

Soutenues le 22 Avril 1971 devant la Commission d'Examen

M. PASCAUD, *Président*
M. DUBERT } *Examinateurs*
M. POLONOVSKI }
M. PICARD, *Invité*

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(mention Sciences)

PAR

Madame Danielle VEISSIÈRE

1re THÈSE

IDENTIFICATION, ISOLEMENT ET STRUCTURE DE LIPOPROTEINES SÉRIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

2e THÈSE

LES PHOSPHOLIPIDES DE LA BILE

Soutenues le 22 Avril 1971 devant la Commission d'Examen

M. PASCAUD, *Président*
M. DUBERT } *Examinateurs*
M. POLONOVSKI }
M. PICARD, *Invité*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Professeur André LEMAIRE,

Membre de l'Académie de Médecine,

en remerciement respectueux pour le bienveillant soutien qu'il m'a toujours accordé.

A Monsieur le Professeur Jacques POLONOVSKI,

pour l'intérêt qu'il n'a cessé de porter à ce travail, et pour la bienveillante attention qu'il m'a toujours accordée,
j'adresse le témoignage de ma reconnaissance.

J'adresse mes respectueux remerciements

A Monsieur le Professeur PASCAUD,

qui a bien voulu me faire l'honneur de présider cette thèse et pour la bienveillante attention avec laquelle il a examiné ce travail.

A Monsieur le Professeur DUBERT,

qui a bien voulu faire partie du Jury de cette thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41873410_0001

A Monsieur le Professeur Jacques PICARD

qui m'a accueillie dans son laboratoire,
m'a initiée aux méthodes biochimiques,
n'a cessé de me guider et de m'encourager
dans la réalisation de ce travail ;
qui m'a honorée, en toutes circonstances,
de son amitié.
Qu'il trouve ici toute l'expression de
ma profonde gratitude et mon respectueux
attachement.

A tous mes amis du Laboratoire de Biochimie du C.H.U. Saint-Antoine qui n'ont cessé de m'encourager dans ce travail, j'adresse mes remerciements.

I N T R O D U C T I O N

INTRODUCTION

L'étude des lipoprotéines plasmatiques est intimement liée au développement des techniques de fractionnement par l'électrophorèse puis par l'ultracentrifugation. Ces dernières ont permis d'individualiser plusieurs familles de lipoprotéines suivant leur différente densité de 0,950 à 1,25 :

- les lipoprotéines très légères (very low density lipoproteins ou VLDL) ;
- les lipoprotéines légères (low density lipoproteins ou LDL) ou β-lipoprotéines ;
- les lipoprotéines lourdes (high density lipoproteins ou HDL) ou α-lipoprotéines ;
- les lipoprotéines très lourdes (very high density lipoproteins ou VHDL), riches en acides gras libres et en lysolécithines.

Enfin, des chylomicrons apparaissent dans le plasma quelques heures après l'ingestion d'un repas gras.

TABLEAU I

Le tableau I rappelle la classification des lipoprotéines du sérum humain avec leur caractère de flottation et leur composition chimique. Ces familles se distinguent nettement par leurs paramètres physicochimiques, leur structure, leurs propriétés immunologiques et

	DENSITE	COMPOSITION en %					TAUX NORMAL DANS LE SERUM g/l
		PROTEINES	PHOSPHOLIPIDES	CHOLESTEROL LIBRE	ESTERS DE CHOLESTEROL	GLYCERIDES	
Chylomicrons	d < 0,960	2	7	2	5	84	–
Lipoprotéines très légères : VLDL	d < 1,006	10	18	7	12	53	0,5 à 1,5
β-lipoprotéines légères	1,006 < d d < 1,019						0,3 à 0,9
β-lipoprotéines LDL	1,019 < d d < 1,063	21	22	8	37	12	3,0 à 4,3
α-lipoprotéines HDL	1,063 < d d < 1,21	50	22	4	14	10	2,1 à 3,8
Lipoprotéines très lourdes : VHDL	d ≥ 1,21	acides gras libres lysolécithines					

TABLEAU I

Les lipoprotéines plasmatiques humaines.

leur métabolisme.

C'est ainsi que les deux groupes les plus importantes : les β-lipoprotéines ou LDL, les α-lipoprotéines ou HDL, se distinguent par leur richesse en cholestérol pour les LDL et en phospholipides pour les HDL.

L'étude des lipoprotéines du sérum au cours de l'obstruction biliaire, appelée aussi cholostase, présente diverses anomalies (1 - 2) par rapport au sérum normal. On note dans le sérum d'obstruction biliaire, une augmentation importante des phospholipides et du cholestérol et l'ultracentrifugation de ce sérum révèle une diminution des lipoprotéines de forte densité (HDL) et un accroissement des lipoprotéines de faible densité (LDL).

Les caractères de précipitation par les polyanions sont aussi modifiés : l'héparine qui, en présence de cations bivalents, précipite sélectivement les B-lipoprotéines du sérum normal, insolubilise, dans le cas de sérum d'obstruction biliaire, à la fois les β- et les α-lipoprotéines comme le vérifie l'électrophorèse de zone (2 - 3). Le polyvinyl-pyrrolidone (P.V.P.) révèle également des caractères d'insolubilisation particuliers en présence du sérum de cholostase (4).

Enfin, les lipoprotéines du sérum de sujets atteints d'obstruction biliaire donnent une réaction de floculation caractéristique : la réaction de Jirgl, qui n'apparaît pas avec les lipoprotéines du sérum de sujets normaux ou atteints d'affections diverses (hépatiques comprises mais sans cholostase (5).

Les proportions anormales des LDL et HDL et les caractères de précipitation particuliers des lipoprotéines d'obstruction biliaire,

nous ont incités à rechercher les modifications qui, survenant dans la nature de ces lipoprotéines, pourraient en être la cause. En effet, on peut concevoir qu'une proportion différente en lipides et en protéines modifie les caractères des lipoprotéines. On peut aussi se demander si ces propriétés inhabituelles n'appartiennent pas à des lipoprotéines chimiquement et immunologiquement distinctes des lipoprotéines décelées dans le sérum normal. Ces hypothèses nous ont donc conduits à mettre au point des méthodes de fractionnement et d'isolement des lipoprotéines dans le sérum d'obstruction biliaire et a étudier les propriétés chimiques et immunologiques de ces substances.

Dans la première partie de ce travail sont résumées les techniques générales mises au point pour fractionner et étudier les lipoprotéines sériques au cours de la cholostase.

Dans la seconde partie sont exposés les résultats obtenus par ces techniques :

- identification, par leurs propriétés immunologiques, des lipoprotéines sériques anormales dans l'obstruction biliaire ;

- isolement et composition chimique des lipoprotéines sériques anormales dans l'obstruction biliaire ;

- étude des lipoprotéines sériques anormales dans l'obstruction biliaire expérimentale ;

L'origine et la signification de ces anomalies sont analysées dans la troisième partie où sont successivement étudiées les conséquences de l'obstruction biliaire sur la mobilisation des phospholipides et sur la production d'apolipoprotéines circulantes.

PREMIERE PARTIE

MATERIEL et METHODES

I MATERIEL D'ETUDE

A - L'étude de l'obstruction biliaire chez l'homme a été réalisée chez 40 patients en état de rétention biliaire d'origine calculeuse ou néoplasique (30 cas), ou en rétention biliaire intra-hépatique contrôlée par laparotomie (10 cas). L'étude des lipoprotéines sériques a donné lieu aux mêmes observations dans les deux groupes de sujets.

B - L'étude expérimentale de l'obstruction biliaire a été effectuée chez le chien :

- 30 chiens ont subi sous anesthésie une ligature complète des voies biliaires ;
- 5 chiens ont subi une ligature partielle des voies biliaires intéressant les deux-tiers de celles-ci ;
- 5 chiens ont subi une ligature partielle des voies biliaires intéressant un tiers de l'arbre biliaire ;
- 5 chiens normaux ont servi de témoins. Chez ces aminaux, le sang est prélevé quotidiennement à partir du 4e jour après l'intervention (5 ml). Des prélèvements plus importants sont pratiqués entre le 10e et le 15e jour. Passé ce délai, l'apparition de phénomènes inflammatoires (un choléperitoine est observé) interrompt les prises de sang.

II PREPARATION DES LIPOPROTEINES

A - PREPARATION DES VLDL, LDL et HDL.

Les lipoprotéines du sérum sont séparées par ultracentrifugation préparative en milieu NaCl-KBr (2 - 6) selon la méthode décrite par Havel (ultracentrifugeuse Spinco L2-50, rotor 40, 103 000 G).

Une première ultracentrifugation est effectuée en milieu de densité 1,063 durant 20 heures, à l'issue de laquelle la phase supérieure contenant les lipoprotéines légères est prélevée et soumise à une nouvelle centrifugation en milieu de densité 1,019 durant 18 heures, séparant ainsi les LDL ($1,019 < d < 1,063$) des VLDL ($d < 1,006$). Les lipoprotéines lourdes, HDL, après centrifugation du sérum en milieu de densité 1,063, sont isolées par une nouvelle centrifugation en milieu de densité 1,21 durant 24 heures. Les fractions lipoprotéiniques ainsi obtenues sont dialysées 24 heures contre une solution de NaCl 0,15 M.

B - PREPARATION DES CHYLOMICRONS.

Les chylomicrons sont obtenus par ultracentrifugation (30 minutes à 15 000 t/mn) de sérum de sujets normaux ayant été soumis à un repas gras (250 g de crême fraîche). Le sang est prélevé 4 heures après le repas.

III ANALYSE IMMUNOLOGIQUE

A - IMMUNOELECTROPHORESES.

Les lipoprotéines sériques sont caractérisées par immunodiffusion selon le procédé d'Ouchterlony en gel d'agarose à 1 % et par immunoélectrophorèse en milieu véronal à pH 8,2 selon la microméthode de Grabar et Williams (7).

Dans certains cas, la communauté antigénique des lipoprotéines de deux échantillons est recherchée sur la même lame en soumettant l'un à une électrophorèse et l'autre à une diffusion simple. Cette technique consiste dans un premier temps à déposer 0,03 µl du premier échantillon de lipoprotéines (60 µg de lipoprotéines exprimés en protéines) dans le réservoir sur la lame de gélose et à la soumettre à l'électrophorèse 1 heure 15 mn sous 120 volts à la température du laboratoire, puis dans un deuxième temps à déposer l'autre échantillon dans un réservoir ménagé à 5 mm du précédent du côté cathodique. L'immunsérum est réparti dans les gouttières latérales. Après diffusion pendant 48 heures à 4° C et lavage, on procède à l'examen à l'état frais et à la coloration des lames selon les techniques usuelles. Les protéines sont colorées par d'Aminoschwartz et le Bleu de Coomasie ; les lipoprotéines sont révélées par le Noir Soudan (8).

B - IMMUNSERUMS.

Les immunsérums utilisés sont :

- Immunsérums du commerce.

. sérum équin antisérum humain normal (n° 742 Institut Pasteur) ;

. sérum de lapin anti-β-lipoprotéines sériques (Behringwerke) ;

. sérum de lapin anti-α-lipoprotéines sériques (Behringwerke) ;

. sérum de lapin anti-albumine (Behringwerke).

- Immunsérums préparés au laboratoire par immunisation de lapins.

. sérum de lapin anti-LDL sériques humaines normales ;

. sérum de lapin anti-HDL sériques humaines normales ;

. sérum de lapin anti-VLDL sériques humaines normales ;

. sérum de lapin anti-LDL normales délipidées ;

. sérum de lapin anti-HDL normales délipidées ;

. sérum de lapin anti-VLDL normales délipidées ;

. sérum de lapin anti-LDL sériques de sujets atteints d'obstruction biliaire (anti-LPC) ; (ces LDL de patients présentant une obstruction biliaire sont appelées : lipoprotéines de cholostase : LPC).

. sérum de lapin anti-LDL sériques de chiens atteints

d'obstruction biliaire (anti-LPC) ;

• sérum de lapin anti-sérum de chien normal.

C - IMMUNISATION DES LAPINS.

A cet effet, les lapins reçoivent dans un premier temps une émulsion préparée avec 5 ml d'une solution contenant l'antigène envisagé et 5 ml d'adjuvant complet de Freund (Difco) en injection intra-péritonéale, intra-musculaire et dans les aires ganglionnaires selon la technique de Rosa-Augustin (9). La dose de lipoprotéines injectée est de 7 mg (exprimés en protéines). A partir du 21e jour, 5 injections intra-veineuses de rappel (doses progressives allant de 250 µg à 1 mg de protéines) sont pratiquées tous les deux jours. L'immunisation est contrôlée par immunodiffusion et immunoélectrophorèse. L'animal est saigné à blanc 5 jours après le dernier rappel.

D - RECHERCHE DU POINT D'EQUIVALENCE.

A 0,2 ml d'une solution d'immunsérum on ajoute 0,1 ml d'une solution d'antigène à des concentrations croissantes. Après un contact de 4 heures à 4° C, le complexe antigène-anticorps est séparé par centrifugation 15 minutes à 3 000 t/mn. Le précipité obtenu est lavé deux fois dans un tampon Tris 0,01 M NaCl 0,15 M. Il est ensuite redissous dans 0,3 ml de carbonate de sodium à 2 % dans de la soude N/10. Les protéines sont dosées selon la technique de Lowry (10). On trace la

courbe de précipitation spécifique antigène-anticorps pour déterminer le point d'équivalence (11).

E - EPUISEMENT DES ANTICORPS.

L'épuisement en anticorps de l'immunsérum par l'antigène correspondant est obtenu par la mise en contact de l'immunsérum et de l'antigène dans les conditions du point d'équivalence. Le complexe antigène-anticorps est séparé par centrifugation à 3 000 t/mn pendant 15 minutes. Le surnageant est épuisé par une nouvelle addition d'antigène. Le précipité éventuel est écarté par centrifugation. Cette opération est renouvelée jusqu'à disparition complète d'un précipité.

F - PURIFICATION DE L'ANTIGENE.

On vérifie la pureté de l'antigène, d'une part en s'assurant que l'addition de nouvelles quantités d'anticorps dans les conditions du point d'équivalence n'entraîne plus de précipitation, d'autre part en effectuant un contrôle immunologique par immunodiffusion et immunoélectrophorèse.

IV PRECIPITATION PAR LES POLYANIONS

La précipitation des lipoprotéines par l'héparine en présence d'ions Ca^{++} est effectuée par la méthode de Burstein et Samaille (12) selon laquelle un volume de sérum ou de solution lipoprotéinique est mélangé à 0,2 volume d'héparine à 1 %, et 10 volumes de chlorure de calcium 0,025 M. Le précipité obtenu est redissous et dialysé en milieu isotonique. L'examen de ce précipité est effectué par électrophorèse et immunoélectrophorèse.

V REACTION DE JIRGL

Cette réaction est pratiquée sur les différents serums, sur les préparations de lipoprotéines de patients et d'animaux atteints d'obstruction biliaire. Elle est également constamment utilisée au cours de la purification de ces lipoprotéines.

Dans le présent travail, cette réaction de floculation est réalisée sur des échantillons de 0,4 à 0,8 ml selon une technique personnelle (5).

A 0,8 ml de sérum ou de solution d'épreuve sont ajoutés 2 ml de potasse 0,1 M puis 2 ml d'acide sulfosalicylique à 20 %. Par centrifugation, on obtient un extrait sulfosalicylique dont 2,5 ml sont prélevés et additionnés à 0,5 ml d'acide phosphotungstique (à 5 % dans HCl 2 N). Le précipité ainsi obtenu est centrifugé et redissous dans 3,25 ml de carbonate de sodium à 10 %. L'addition de 0,1 ml de réactif des phénols de folin provoque une précipitation caractéristique dans le cas des lipoprotéines sériques de patients ou d'animaux atteints d'obstruction biliaire. La réaction est dite positive. Avec le sérum normal ou avec le sérum de sujets atteints d'affections diverses, hépatiques comprises mais non cholostatiques, l'addition du réactif des phénols ne provoque aucune précipitation. La réaction est dite négative.

La pratique de micro-réactions portant sur 0,4 ml d'échantillon implique une réduction de volume des réactifs dans la même proportion.

VI EXTRACTION DES LIPIDES

A - EXTRACTION DES LIPIDES DES LIPOPROTEINES SERIQUES ET DE LA BILE.

L'extraction des lipides totaux des préparations de lipoprotéines sériques et des lipides totaux de la bile est effectuée selon la technique de Folch Pi (13) par le mélange méthanol-chloroforme (1.2 v/v).

L'extrait lipidique est purifié selon Folch par lavages avec le mélange chloroforme-méthanol-eau (3-48-47 v/v).

B - EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX DES TISSUS.

L'extraction des lipides totaux des tissus est pratiquée par le mélange méthanol-chloroforme (2-1 v/v) sur un broyat de tissu obtenu à l'ultraturrax. Après centrifugation, la phase méthanol-chloroforme est évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif et les lipides sont repris dans le chloroforme.

C - EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES SUR LES DIFFERENTES FRACTIONS LIPIDIQUES AINSI OBTENUES.

Les phospholipides sont extraits par précipitation acétonique à - 20° C pendant 16 heures. La vérification de cette extraction

est effectuée par chromatographie sur gel de silice dans une phase contenant chloroforme-méthanol-eau (65-25-4 v/v) (phase de Wagner - Horhammer - Wolff).

La composition en phospholipides de ces extraits est également établie par analyse chromatographique en gel de silice dans le solvant de Wagner - Horhammer - Wolff.

La localisation des différents phospholipides est décelée par exposition à des vapeurs d'iode en présence de divers témoins.

Les spots sont récupérés et élués dans le chloroforme et les quantités de phospholipides, présentes dans ces fractions, sont déterminées par dosage du phosphore (voir chapitre VII : DOSAGES).

VII DOSAGES

On dose les phospholipides après minéralisation et dosage du phosphore selon la méthode de Delsal et Manhoun (14), la masse des phospholipides étant obtenue en multipliant la masse du phosphore par 25. Les triglycérides sont dosés par la technique de Van Handel et Zilversmit (15). Le glycérol libéré est oxydé par l'acide périodique et l'aldéhyde formique libéré est dosé par l'acide chrometropique. Le cholestérol libre et estérifié est obtenu par la méthode de Delsal (16). Les esters de cholestérol sont calculés en fonction de l'acide linoléique.

D'autre part, la teneur en protéines est déterminée par la méthode de Lowry (10).

ANALYSE DES ACIDES AMINES.

L'analyse des acides aminés est effectuée sur autoanalyseur après hydrolyse des lipoprotéines délipidées 48 heures à 100° C dans HCl 6 N.

VIII ANALYSE DES ACIDES GRAS PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE

A - SAPONIFICATION ET METHYLATION DES ACIDES GRAS

La méthode employée est une méthode dérivée de celle de Van Vijngaerden (17).

Après évaporation du chloroforme, l'extrait lipidique est saponifié par 2 ml de potasse méthanolique 0,5 N. La méthylation est catalysée par le fluorure de bore (BF_3). Pour permettre une meilleure extraction des acides gras courts méthylés, on effectue un relargage à l'aide de 0,5 ml d'une solution saturée de NaCl. Les acides gras méthylés sont extraits par le pentane (pentane Merck rectifié au laboratoire). Par centrifugation on sépare trois phases : la phase pentanique supérieure contenant les esters méthyliques, une phase intermédiaire méthanol-eau contenant les parties polaires des lipides, et un culot de chlorure de sodium.

B - CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES ACIDES GRAS.

On utilise une colonne de trois mètres dont la phase stationnaire est le di-éthyl-glycol-succinate, fixé sur du chromosorb G-100-120 mesh à la concentration de 15 %. Le gaz vecteur est un flux d'azote U ordinaire. La chromatographie est effectuée en température

isotherme à 170° C.

L'appareil est un chromatographe Girdel dont les caractéristiques d'emploi sont les suivantes :

- température du four : 170° C ;
- température du détecteur : 200° C ;
- pression d'azote à l'entrée : 1,8 bar ;
- débit d'azote : 40 ml/mn ;
- détection par ionisation de flamme d'hydrogène : pression d'hydrogène : 2 bar ; débit d'air comprimé : 400 ml/mn ;
- enregistreur servo-riter ;

La hauteur du plateau théorique équivalent est calculée sur le pic de méthyl-palmitate.

IX DELIPIDATION DES LIPOPROTEINES SERIQUES

A - DELIPIDATION DES LDL ET DES VLDL.

Un volume de lipoprotéines légères : LDL (2 mg exprimés en protéines) obtenues par ultracentrifugation est agité avec 10 volumes d'éther éthylique distillée. Les réactifs sont concervés à + 4° C. L'agitation est poursuivie 15 heures en tubes bouchés émeri à + 4° C. Après centrifugation, décantation de la couche éthérée et lavage à l'éther (3 fois), la fraction délipidée est isolée et les produits sont dosés par la méthode de Lowry (10).

B - DELIPIDATION DES HDL.

A Un volume de solution de lipoprotéines de forte densité (HDL) séparées par ultracentrifugation, sont ajoutés 10 volumes de mélange éthanol-éther (3 - 1 v/v). On laisse en contact 15 heures à - 20° C (les réactifs sont préalablement refroidis à - 20° C). Après centrifugation (10 mn à 4 000 t/mn) et décantation de la phase surnageante, le précipité obtenu est lavé deux fois par addition du mélange éthanol-éther (3 - 1 v/v). On termine par un lavage à l'éther. Les protéines sont ensuite solubilisées en tampon phosphate 0,022 M pH 7 à la température du laboratoire.

X FRACTIONNEMENT PAR GEL FILTRATION

A - FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX G 200.

Le fractionnement des protéines et des lipoprotéines du sérum entier ou du filtrat sulfosalicylique de sérum est réalisé par gel filtration sur colonne de Séphadex G 200 (200-400 mesh) de dimensions 40 x 3,2 cm. La préparation du gel de Séphadex est effectuée dans un tempon Tris hydroxyméthyl-aminométhane 0,1 M pH 8,0 (18). 100 à 200 mg de protéines et lipoprotéines sériques sont déposées sous un volume de 3 ml (tampon Tris ou sérum) sur la colonne réfrigérée à + 5° C. L'élution est effectuée avec le même tampon et le débit réglé à 0,5 ml/mn. Des fractions de 5 ml sont recueillies. L'absorption de l'éluat est renregistrée sur un appareil Uvicord LKB.

B - FRACTIONNEMENT SUR BIO-GEL A-50 M (100-200 MESH).

La colonne utilisée a un diamètre de 3,5 cm et une hauteur de 100 cm. La préparation et l'élution du gel sont effectuées en tampon Tris HCl 0,18 M EDTA 0,02 % pH 8,9 (19). L'élution est pratiquée avec un débit de 0,3 ml/mn et des fractions de 5 ml sont recueillies. L'absorption de l'éluat est enregistrée à 280 mμ sur un appareil Uvicord LKB. Les caractéristiques de cette colonne permettent de déposer environ 10 mg de lipoprotéines (exprimés en protéines).

DEUXIEME PARTIE

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I MISE EN EVIDENCE DES LIPOPROTEINES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE CHEZ L'HOMME

L'examen immunoélectrophorétique des lipoprotéines légères sériques d'obstruction biliaire (LPC $1,019 < d < 1,063$) révèle, en présence de l'immunsérum anti-LPC, les constituants suivants (fig. 1) :

a) β -lipoprotéines ;

b) Dans certains cas (30 % des sérums examinés) des lipoprotéines de même mobilité que les β-lipoprotéines mais de site antigénique α.

c) Enfin, tout près du réservoir, des lipoprotéines particulières caractérisées par un arc de précipitation simple ou double entièrement distinct des arcs donnés par les β- et les α-lipoprotéines.

L'examen immunoélectrophorétique de ces mêmes LPC en présence d'immunsérums : anti-sérum humain normal, anti- β-lipoprotéines et anti- α lipoprotéines donnent uniquement deux arcs de précipitation : un arc β et un arc α. En outre, l'examen en immunoélectrophorèse de lipoprotéines sériques de sujets normaux en présence d'immunsérum anti-LPC ne révèle que les arcs de précipitation β et α que l'on observe avec un antisérum normal.


1
2

Ainsi, ces observations montrent-elles la présence chez l'homme de lipoprotéines sériques particulières (LPSC), observées exclusivement dans le sérum d'obstruction biliaire. Ces lipoprotéines n'ont pu être mises en évidence dans le sérum de sujet normal par les méthodes immunologiques précédentes.

II IDENTIFICATION DES LIPOPROTEINES SERIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE

Pour caractériser les lipoprotéines particulières de l'obstruction biliaire dans la fraction sérique LDL (LPC), celle-ci est débarrassée de ses éléments normaux. Les lipoprotéines légères de cholostase (2 à 5 mg exprimés en protéines) sont traitées soit successivement par les immunsérums anti-β et anti-α lipoprotéines normales (Behringwerke), soit par un immunsérum anti-sérum humain normal (N° 742 Institut Pasteur), en se plaçant si possible dans les conditions les plus proches du point d'équivalence. Les complexes précipités β-lipoprotéines-anti-β-lipoprotéines, α-lipoprotéines-anti-α-lipoprotéines sont éliminés par centrifugation. On vérifie que l'addition d'un léger excès d'anticorps n'est suivie d'aucune précipitation. Cependant, l'addition d'héparine en présence d'ions calcium entraîne un nouveau précipité de lipoprotéines. De même, l'addition d'immunsérum spécifique anti-LPC aux préparations de LPC ainsi épuisées en éléments normaux provoque la formation d'un précipité.

De telles précipitations n'apparaissent pas avec des lipoprotéines de sérum normal préalablement épuisées en β et α-lipoprotéines selon le procédé décrit ci-dessus.

- Ultracentrifugation ($1,019 < d \leq 1,063$)

- Elimination des VLDL, β-lipoprotéines, α-lipoprotéines par des antisérums appropriés

- Elimination des complexes antigène-anticorps par centrifugation.

ADDITION

Héparine, Ca^{++}	Sérum anti-LPC
Précipitation des LPSC	Complexes LPSC-anti-LPSC

TABLEAU II

Mise en évidence des LPSC.

Ainsi, les lipoprotéines légères (LPC) de sérum de patients atteints d'obstruction biliaire contiennent-elles des lipoprotéines supplémentaires qui paraissent être absentes du sérum de sujets normaux.

III IDENTIFICATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES DES LIPOPROTEINES SERIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE

Les anticorps anti-β-lipoprotéines et anti-α lipoprotéines contenus dans l'immunsérum anti-LPC sont épuisés par additions successives à l'antisérum, de β-lipoprotéines puis d'α-lipoprotéines normales. La précipitation complète des anticorps anti-β-lipoprotéines et anti-α-lipoprotéines est effectuée dans les conditions du point d'équivalence, déterminé préalablement.

Les complexes β-lipoprotéines-anti-β-lipoprotéines et α-lipoprotéines-anti-α-lipoprotéines sont écartés par centrifugation. Après vérification que l'addition de β et d'α-lipoprotéines n'entraîne pas de nouvelle précipitation, on ajoute des lipoprotéines légères de cholostase (LPC). On observe alors une nouvelle précipitation. Le complexe précipité obtenu est centrifugé, lavé 3 fois dans 1 ml de NaCl 1,5 M, mis en solution dans NaCl 4 M, pH 1,5 afin de dissocier le complexe. Cette préparation est ensuite soumise à une ultracentrifugation de 24 heures dans un milieu KBr de densité 1,21. La fraction surnageante contient l'antigène. Après dialyse et concentration de la fraction lourde, on peut caractériser, par immunodiffusion en agarose contre des lipoprotéines d'obstruction biliaire, la présence d'anticorps anti-lipoprotéines spécifiques d'obstruction biliaire (anti-LPSC).

En effet, aucun arc de précipitation n'est observé lorsque l'immunodiffusion de l'anticorps ainsi récupéré est pratiqués contre les lipoprotéines et les protéines de sérum normal (Fig. 2).

De même, la présence de ces anticorps spécifiques (anti-LPSC) a pu également être caractérisée après traitement de l'immunsérum anti-LPC par addition de sérum humain normal.

Enfin, après épuisement et traitement identiques effectués sur des sérums anti-LDL et anti-HDL sériques normales, aucun arc de précipitation avec les lipoprotéines de cholostase n'est révélé. Ces expériences démontrent la présence d'anticorps spécifiques d'un constituant lipoprotéique absent du sérum normal et trouvé exclusivement dans le sérum d'obstruction biliaire.

Ces lipoprotéines anormales décelées uniquement dans l'obstruction biliaire sont appelées lipoprotéines spécifiques de la cholostase, LPSC.

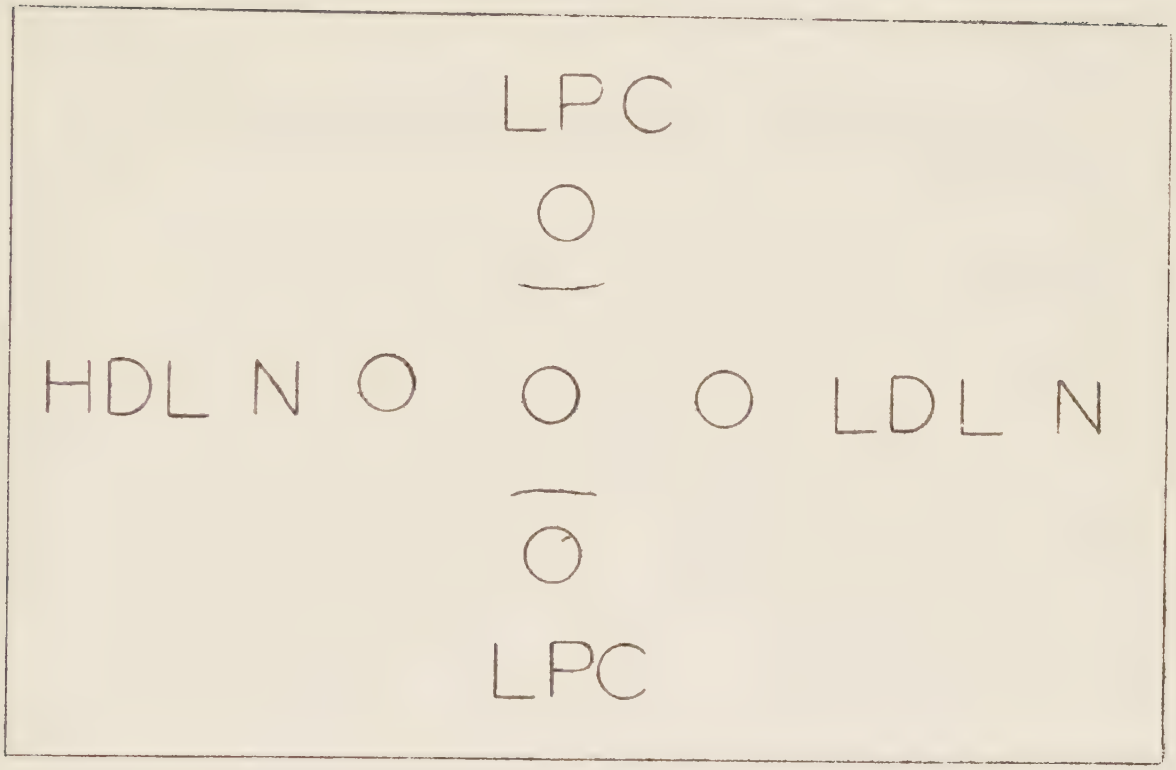


FIGURE 2

Identification de l'anticorps spécifique des lipoprotéines anormales après dissociation du complexe LPSC-anti-LPSC.

Au centre : Anticorps anti-LPSC obtenus après dissociation du complexe antigène-anticorps.

IV ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES SERIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE

A - FRACTIONNEMENT DES LIPOPROTEINES LEGERES DU SERUM DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE (LPC).

La caractérisation par immunodiffusion des lipoprotéines contenues dans les LDL (1,019 < d < 1,063) de sérum d'obstruction biliaire (LPC), montre l'hétérogénéité de cette fraction.

Il est impossible, par simple ultracentrifugation, de séparer complètement les différentes lipoprotéines de sérum de patients atteints d'obstruction biliaire. Pour cette raison, nous avons tenté de fractionner par gel filtration, les lipoprotéines préalablement obtenues par ultracentrifugation. Après différents essais de gel filtration sur gel de dextrane (Séphadex G 200) ou d'agarose (Sépharose 4 B), notre choix s'est finalement fixé sur un autre gel d'agarose (Bio-gel A-50 M) (19) dont le pouvoir résolutif nous a donné les meilleurs résultats et dont les caractéristiques d'exclusion moléculaire convenaient mieux à notre problème de séparation.

5 ml de LPC contenant environ 10 mg de lipoprotéines (exprimés en protéines) sont déposés sur une colonne de Bio-gel A-50 M, 100-200 mesh. La gel-filtration est effectuée comme nous l'avons précédemment décrit dans la Première Partie, Chapitre X. Chaque fraction recueillie

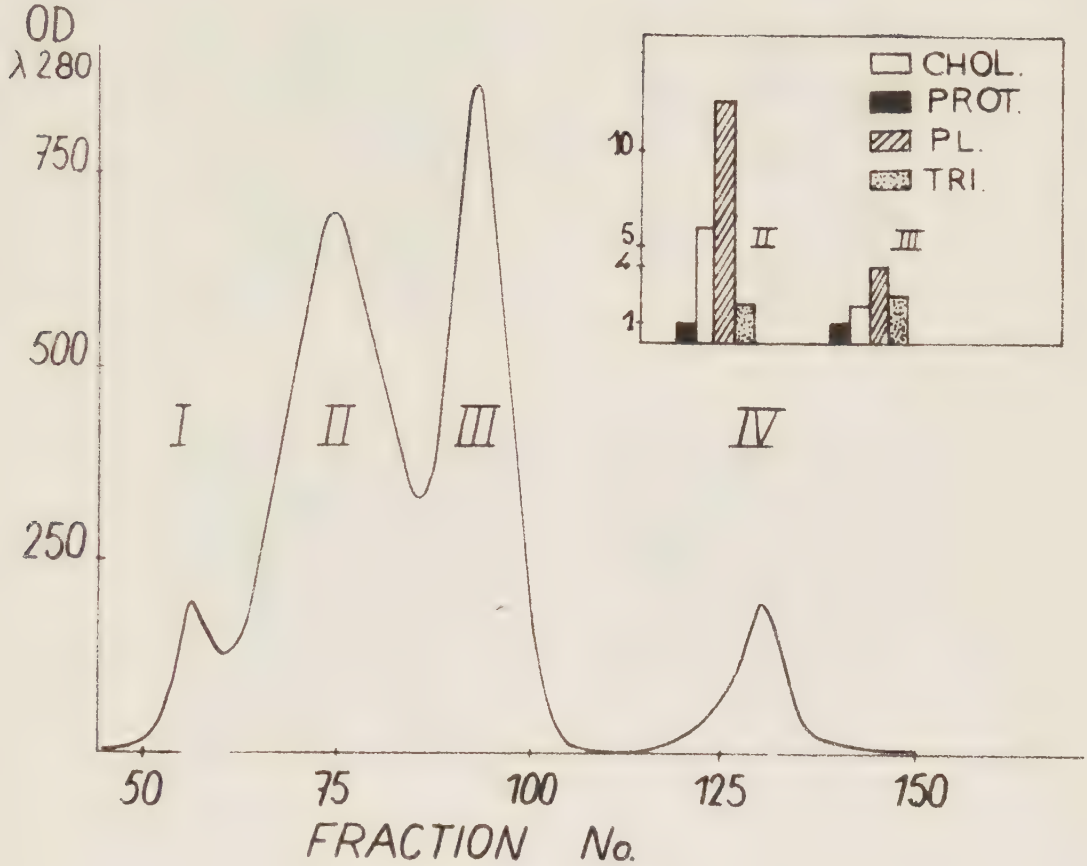
de l'éluat est concentrée, analysée et identifiée par immunodiffusion en agarose (1 %) en présence des immunsérums appropriés, anti-β-lipoprotéines, anti-α-lipoprotéines (Behringwerke), anti-VLDL, antisérum humain normal (n° 742 Institut Pasteur), anti-β et anti- α lipoprotéines délipidées, anti-VLDL délipidées, anti-LPC.

L'analyse de ces fractions est obtenue par dosage sur chacune d'elles, des protéines (10), des phospholipides (14), du cholestérol libre et estérifié (16) et des triglycérides (15).

B - IDENTIFICATION DES FRACTIONS.

Le graphique d'élution traduisant l'absorption à 280 mμ des fractions éluées montre que les LPC du sérum dans l'obstruction biliaire sont séparées en 4 fractions distinctes (Fig. 3). Suivant les sérums de cholostase étudiés, le fractionnement des LPC montre des teneurs en lipoprotéines légèrement différentes.

L'identification des fractions est effectuée en soumettant chacune d'elles, préalablement concentrée, à un contrôle immunologique en présence d'immunsérums appropriés. L'identification des fractions par gel filtration est représentée dans la figure 4. Dans la première fraction sont rassemblées les VLDL ; dans le deuxième fraction se trouvent les lipoprotéines anormales (LPSC), présentes seulement dans le sérum de patients atteints d'obstruction biliaire. Celles-ci ne réagissent pas avec les immunsérums anti-β-lipoprotéines et anti- α-lipoprotéines mais exclusivement avec l'immunsérum anti-LPC. La troisième



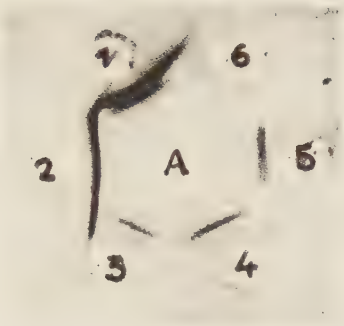
[illegible]

[illegible] fractions [illegible]

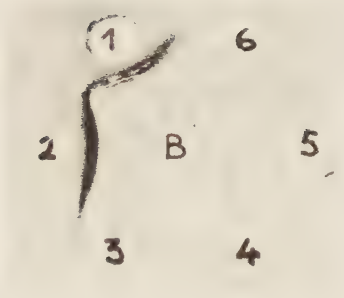
Elution : I : VLDL ; II [illegible] ; [illegible] ;

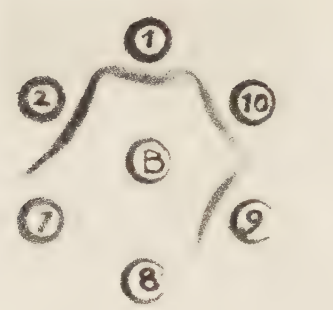
[illegible]

[illegible]


1
6
2
A
5
3
4


1
2
10
A
7
9
8


1
6
2
B
5
3
4


1
2
10
B
7
9
8

fraction est constituée par les β-lipoprotéines principales. Enfin, de petites quantités d'α-lipoprotéines apparaissent en fin d'élution dans la quatrième fraction.

Seules les lipoprotéines contenues dans la fraction II donnent la réaction de floculation de Jirgl ; ce test paraît spécifique des lipoprotéines anormales.

Fraction I	: VLDL
Fraction II	: Lipoprotéines anormales (LPSC)
Fraction III	: β -lipoprotéines
Fraction IV	: α-lipoprotéines.

TABLEAU III

Identification des fractions obtenues par gel filtration des lipoprotéines légères dans l'obstruction biliaire sur Bio-gel A-50 M (100-200 mesh).

V COMPOSITION DE LA LIPOPROTEINE SERIQUE ANORMALE DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE

La composition chimique révèle une richesse particulièrement élevée en phospholipides. Ceux-ci représentent environ 60 % de la masse totale de la lipoprotéine. Le rapport phospholipides/cholestérol est voisin de 2. Le cholestérol est présent davantage sous forme libre que sous forme estérifiée. La quantité des triglycérides est particulièrement flaible. La partie peptidique ne représente que 1,5 % de la masse de la lipoprotéine.*

CONSTITUANTS	EN %
Protéines	1,3
Phospholipides	58,4
Cholestérol libre	17,9
Esters de cholestérol	19,4
Triglycérides	3

TABLEAU IV

Composition chimique des LPSC.

(Les résultats sont exprimés en pourcentage de la masse totale de la lipoprotéine)

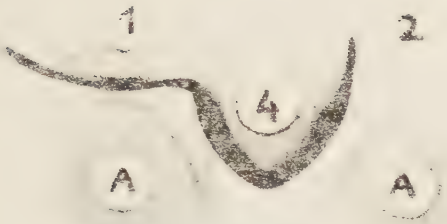
* Pour une masse micellaire comprise entre 1.500.000 et 2.000.000 déterminée d'après les critères d'exclusion en gel filtration, la partie peptidique correspond à une masse de 15.000 à 25.000. Cette valeur correspond précisément à la masse moléculaire généralement attribuée aux différents types de lipopeptide (15.000 à 20.000).

VI PROPRIETES IMMUNOCHIMIQUES DES LIPOPROTEINES SERIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE

A - COMPARAISON ENTRE LES LIPOPROTEINES SERIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE ET LES LDL ET HDL DE SERUM NORMAL.

La composition des lipoprotéines anormales spécifiques de l'obstruction biliaire, LPSC, montre une très forte proportion de phospholipides semblable à celle des HDL. Cependant, ces lipoprotéines ont la même constante de flottation que les LDL ($1,019 < d < 1,063$). L'antigénicité particulière des LPSC résulterait-elle d'une altération des lipoprotéines normales du sérum ? Pour ce, nous avons comparé en double diffusion les lipoprotéines anormales isolées dans la fraction II avec les β-lipoprotéines natives ou délipidées et avec les α-lipoprotéines natives ou délipidées de sérum normal. Cet examen a été effectué en présence de divers immunsérums : sérum anti-LPC, sérum anti-β-lipoprotéines, sérum anti-β-lipoprotéines délipidées, serum anti-α-lipoprotéines, sérum anti-α-lipoprotéines délipidées.

En effet, la délipidation a pour résultat de démasquer divers sites antigéniques, visibles dans les lipoprotéines délipidées et non décelables dans les lipoprotéines natives. Nous avons alors constaté (fig. 5 et 6) qu'en présence du sérum anti-LPC, l'arc de précipitation


1
2
4
A
A

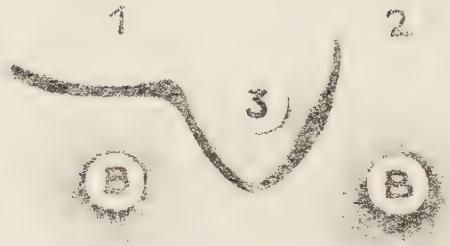

1
2
3
B
B

Figure [illegible]

Comparaison entre les [illegible] et les sol natives [illegible] du sérum normal.

1 : [illegible] ; 2 : [illegible] ; 3 : [illegible] natives [illegible] du sérum normal ; 4 : [illegible] différentes du sérum normal.

Figure [illegible] : A : antigène.

caractéristique des lipoprotéines anormales d'obstruction biliaire, LPSC, n'est pas retrouvé dans les β- et les α-lipoprotéines natives ou délipidées.

D'autre part, les β- et les α-lipoprotéines délipidées réagissent en présence des immunsérums respectifs : anti-β-lipoprotéines délipidées, anti- α -lipoprotéines délipidées, en donnant plusieurs arcs de précipitation, mais la communauté antigénique entre ces sites ainsi démasqués par délipidation et les LPSC n'est pas établie.

Les lipoprotéines anormales d'obstruction biliaire sont immunologiquement distinctes des LDL et HDL sériques normales.

B - COMPARAISON ENTRE LES LIPOPROTEINES SERIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE ET LES LIPOPROTEINES DE SERUM NORMAL d <1,006.

Nous avons comparé les lipoprotéines isolées dans la fraction II avec les chylomicrons (d<0,960). Ceux-ci sont obtenus par ultracentrifugation comme nous l'avons décrit précédemment, à partir de divers donneurs, Le sérum anti-LPC réagit avec les chylomicrons, en gel d'agarose, mais les arcs de précipitation obtenus ne révèlent aucun déterminant antigénique commun avec les lipoprotéines sériques anormales d'obstruction biliaire (fig. 7), contrairement aux observations faites par Schwitzer (20). De même, en présence d'anti-sérum anti-LPC, aucune communauté antigénique ne peut être mise en évidence entre les LPSC et les VLDL de sérum normal (d < 1,006).

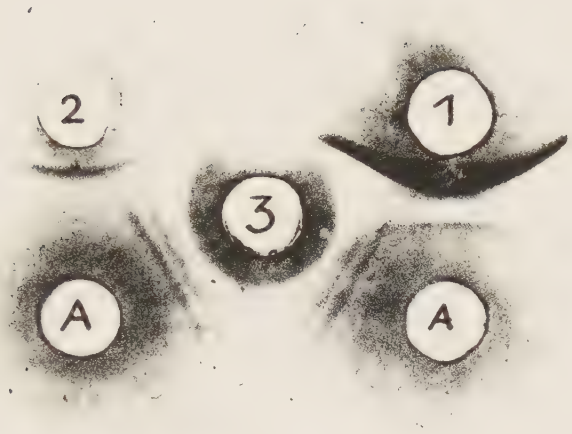


FIGURE 7

Comparaison entre les LPSC et les chylomicrons.

1 : LPC ; 2 : LPSC ; 3 : chylomicrons
d < 0,960

Immunsérum : A : anti-LPC.

C - COMPARAISON ENTRE LES LIPOPROTEINES SERIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE ET LES AUTRES PROTEINES SERIQUES NORMALES.

Les LPSC ne réagissent pas en double diffusion avec l'immunsérum anti-sérum humain normal. Aucun déterminant antigénique commun ne peut être décelé entre les lipoprotéines anormales d'obstruction biliaire et les autres protéines sériques.

En particulier, en gel d'agarose, les LPSC ne réagissent pas avec le sérum anti-albumine et l'albumine ne précipite pas en présence d'anti-sérum anti-LPC (fog. 8).

Le sérum d'obstruction biliaire contient donc des lipoprotéines de site antigénique distinct de celui des lipoprotéines et des protéines de sérum normal.

IMMUNSERUMS DE LAPIN	REACTION IMMUNOLOGIQUE
Anti-β -lipoprotéines	-
Anti-α -lipoprotéines	-
Anti-β -lipoprotéines délipidées	-
Anti-α -lipoprotéines délipidées	-
Anti-VLDL	-
Anti-VLDL délipidées	-
Anti-sérum normal	-
Anti-chylomicrons	-
Anti-albumine	-
Anti-LPC	+

TABLEAU V

Propriétés immunologiques des LPSC natives.

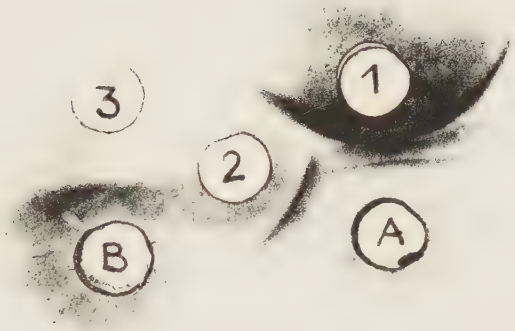


Figure 6

Comparaison entre les LPL et l'albumine.

1 : LPL ; 2 : LPDL ; 3 : albumine

Immunsérums : A : anti-LPL ; B : anti-albumine.

VII ETUDE DE LA FRACTION PROTEIQUE DE LA LIPOPROTEINE SERIQUE ANORMALE DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE

L'absence de caractères immunologiques communs entre les LPSC et les constituants normaux du sérum nécessite l'étude de la partie protéique de cette lipoprotéine.

Pour cette étude, les LPSC, isolées par gel filtration sur Bio-gel, sont délipidées à l'éther à basse température suivant la méthode utilisée pour les LDL et décrite dans la première partie (Chapitre IX). Les phases aqueuse et éthérée sont séparées et soumises à des contrôles immunologiques en double diffusion.

L'immunodiffusion en agarose de la phase aqueuse en présence d'immunsérum anti-LPC, révèle une ligne de précipitation commune à celle des LPSC natives (fraction II). Mais surtout, l'albumine est mise en évidence par immunodiffusion de cette phase aqueuse en présence de sérum anti-albumine. Cet arc de précipitation est nettement distinct de l'arc obtenu en présence de l'immunsérum anti-LPC (fig. 9).

L'antigène albumine apparaît uniquement après délipidation des LPSC (21). Les lipoprotéines anormales d'obstruction biliaire renferment donc, outre le site antigénique caractéristique des LPSC, le site albumine, masqué par la surcharge en lipides.

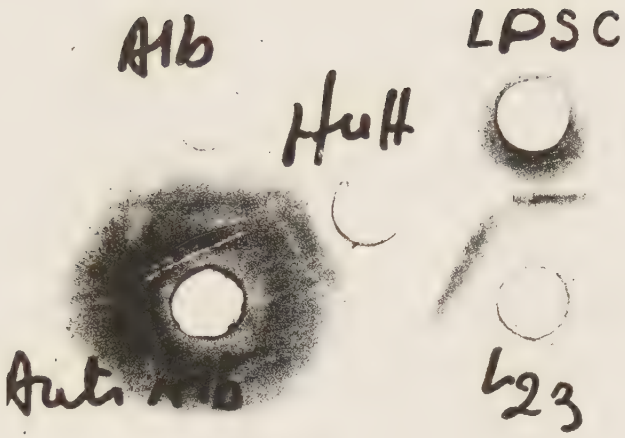


FIGURE 9

Caractères immunologiques des LPSC délipidées.

Etude de la phase aqueuse (pfuff)
En haut à gauche : albumine.
à droite : LPSC.
Au centre : LPSC délipidées : phase aqueuse.
Immunsérums : En bas à gauche : anti-albumine
à droite : ant -LPSC.

L'étude immunologique de la phase éther montre que celle-ci est dépourvue d'albumine et contient exclusivement les déterminants particuliers de la lipoprotéine anormale (fig. 10). Une nouvelle extraction aqueuse de cette phase éthérée permet d'obtenir l'apolipoprotéine exempte d'albumine. Les caractères immunologiques de cette apolipoprotéine ainsi isolée par l'éther, sont distincts de ceux des β-lipoprotéines délipidées. Ils présentent une communauté antigénique avec les VLDL délipidées en présence de sérum anti-VLDL délipidées (fig. 11).

Nous avons étudié la composition en acides aminés de l'apolipoprotéine extraite par l'éther.

ACIDES AMINES	APOLIPOPROTEINE DES LPSC	
ASP	100	9,16
THR	70	6,41
SER	125	11,46
GLU	138	12,64
PRO	41	3,75
GLY	111	10,16
ALA	78	7,15
VAL	60	5,5
CYS	-	-
MET	traces	-
ILEU	41	3,75
LEU	99	9,06
TYR	30	2,74
PHE	43	3,94
LYS	97	8,88
HIS	16	1,46
ARG	43	3,94

TABLEAU VI

Composition en acides aminés de l'apolipoprotéine des LPSC, isolée dans l'éther.

Colonne de gauche : Résultats exprimés sur la base de 100 résidus d'acide aspartique.

Colonne de droite : Résultats exprimés en pourcentage de la masse de l'apolipoprotéine.

Par la richesse en sérine, leucine, lysine et alanine , et l'absence d'acides aminés soufrés, cette apolipoprotéine présente une composition très voisine de celle des apolipopeptides D_1, D_3, D_4 caractéristiques des VLDL, isolés par Levy et Frederickson (22) dans des recherches ultérieurement confirmées par Alaupovic (Apo C) (23). Ces analogies de composition en acides aminés semblent indiquer que l'apolipoprotéine serait constituée par ces apolipopeptides caractéristiques des VLDL, lipopeptides qui sont encore désignés sous le nom de lipopeptide C par Alaupovic et ses collaborateurs.

ACIDES AMINES	VLDL D_1	VLDL D_3	VLDL D_4	APOLIPOPROTEINE DES LPSC
ASP	100	100	100	100
THR	52	67	65	70
SER	126	139	133	125
GLU	184	140	133	138
PRO	16	31	32	41
GLY	25	42	40	111
ALA	63	140	134	78
VAL	37	84	82	60
CYS	0	0	0	-
MET	14	24	23	traces
ILEU	53	0	0	41
LEU	81	72	67	99
TYR	0	28	24	30
PHE	54	60	58	43
LYS	181	81	80	97
HIS	traces	11	12	16
ARG	53	29	34	43

TABLEAU VII

Composition en acides minés des apolipopeptides caractéristiques des VLDL selon les travaux de LEVY et FREDERICKSON (22) et de l'apolipoprotéine des LPSC, isolée dans l'éther

(Résultats exprimés sur la base de 100 résidus d'acide aspartique)

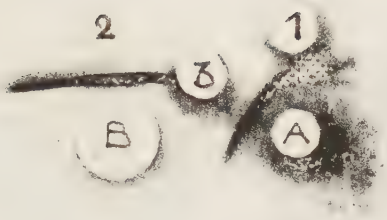


Figure 10

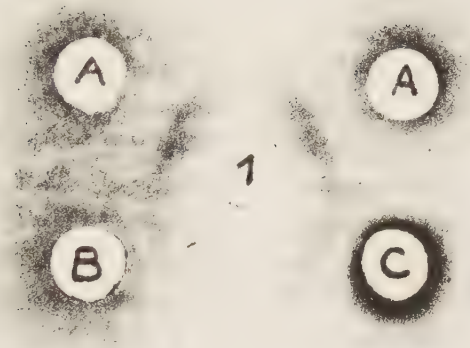
[illegible]

[illegible]

1 : [illegible] ; 2 : [illegible] ; [illegible]

[illegible]

Transducers : A : [illegible] ; [illegible] : [illegible].


A
A
1
B
C

Le calcul de la concentration en albumine, présente exclusivement dans la phase aqueuse, montre que la proportion de celle-ci n'excède pas 15 % des protéines obtenues par délipidation des lipoprotéines anormales.

Les lipoprotéines anormales apparaissent ainsi comme une association entre une apolipoprotéine type Apo C et l'albumine. Toutefois, l'apo C constitue la partie essentielle et l'albumine apparaît comme un constituant mineur contrairement aux résultats d'Alaupovic.,

Bien que la structure protéique de la lipoprotéine anormale s'apparente ainsi à celle des VLDL délipidées, des examens immunologiques ont montré en outre la présence d'un autre déterminant antigénique distinct de l'albumine et de l'Apo C. En présence de l'immunsérum spécifique, la ligne de précipitation caractéristique des LPSC natives et délipidées se dédouble dans certains sérums d'obstruction biliaire, ce qui laisse supposer - en dehors de l'albumine - la présence de deux déterminants. Des préparations ont mis en évidence la communauté antigénique de ce déterminant supplémentaire avec les α-lipoprotéines délipidées.

	LPSC natives	LPSC délipidées
Sérum anti-LPC	+	+
Sérum anti-albumine	-	+
Sérum anti- β -lipoprotéines	-	-
Sérum anti-α -lipoprotéines	-	-
Sérum anti- β -lipoprotéines délipidées	-	-
Sérum anti-α-lipoprotéines délipidées	-	+
Sérum anti-VLDL délipidées	-	+

TABLEAU VIII

Propriétés immunologiques des LPSC natives et délipidées.

VIII ETUDE DES PHOSPHOLIPIDES DE LA LIPOPROTEINE ANORMALE SERIQUE DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE - COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Le sérum des patients atteints d'obstruction biliaire révèle une augmentation importante des phospholipides qui se retrouvent dans la fraction anormale LPSC (fraction II), ainsi que dans les β-lipoprotéines de ce sérum (fraction III). Les phospholipides représentent 60 % de la masse micellaire des LPSC.

La répartition des différents phospholipides dans les lipoprotéines anormales figure dans le tableau IX.

L'examen des phospholipides des LPSC révèle une proportion élevée des lécithines (75 % des phospholipides totaux) (fig. 12). Cette teneur ne se retrouve pas dans les phospholipides des lipoprotéines sériques de sujet normal. Par contre, cette prédominance des phosphatidylcholines se retrouve dans les phospholipides de la bile.

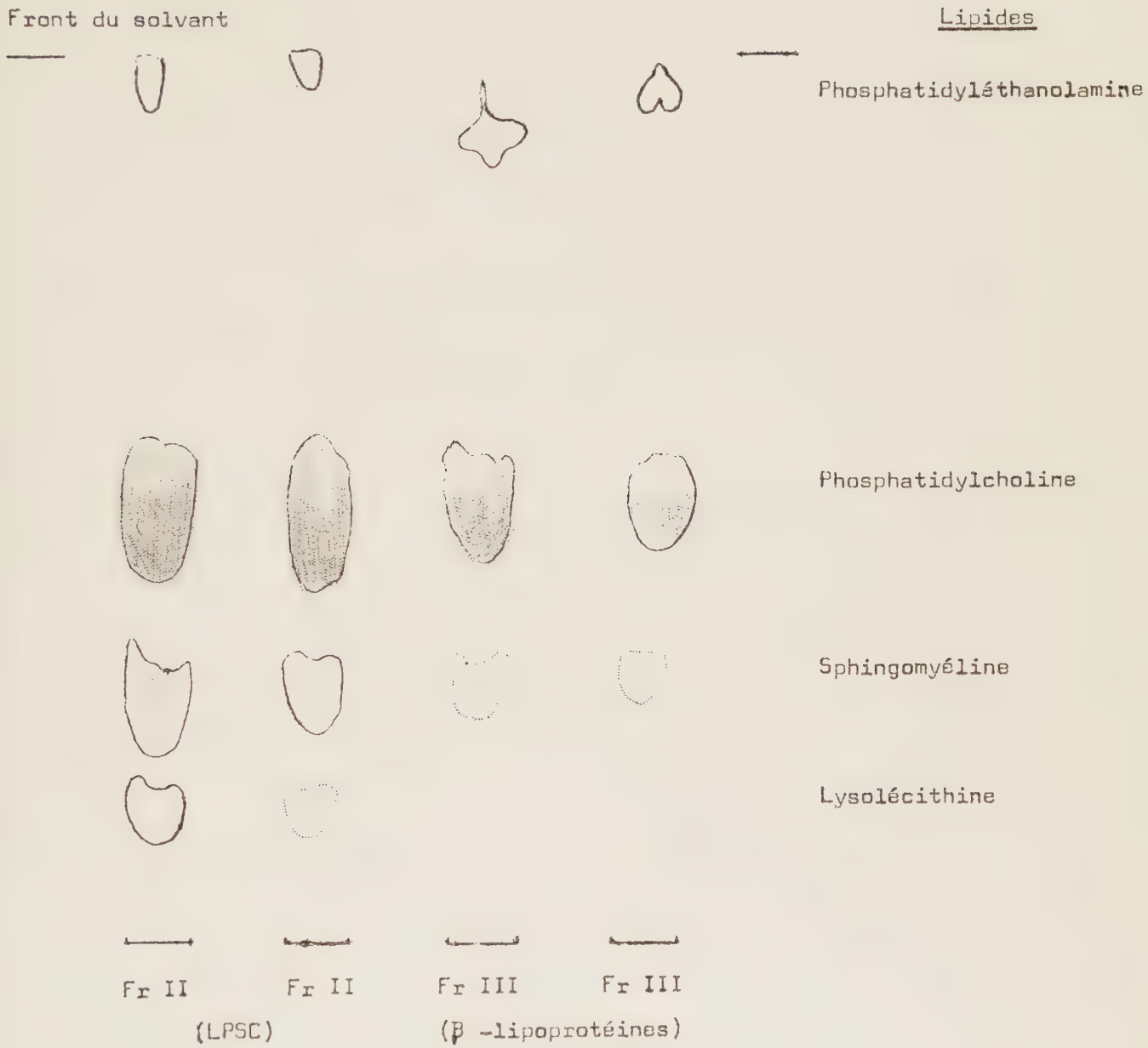


FIGURE 12

Chromatographie unidimentionnelle à simple migration selon Wagner, Horhammer et Wolff.

Phase : Chloroforme-méthanol-eau (65-25-4 v/v).

Lysolécithines	5,7 %
Sphingomyélines	13 %
Phosphatidylcholines	73 %
Phosphatidyléthanolamines	8,3 %

TABLEAU IX

Répartition des différents phospholipides des LPSC.

(Les valeurs sont exprimées en pourcentage des phospholipides totaux).

Nous avons alors étudié la composition en acides gras des phospholipides des lipoprotéines sériques de la cholostase et comparé ces résultats avec la composition en acides gras des phospholipides des lipoprotéines sériques de sérum normal (chylomicrons, VLDL, LDL, HDL) et celle des phospholipides de la bile hépatique et vésiculaire.

L'analyse de la composition en acides gras des phospholipides des lipoprotéines anormales est donnée dans les tableaux X A, B, C

Nous notons que, par rapport aux phospholipides des lipoprotéines de sérum normal, les phospholipides des lipoprotéines anormales, LPSC, montrent une diminution des acides gras poly-insaturés ($C_{18,2}$, $C_{20,4}$) tandis que la proportion relative d'acides gras mono-insaturés et saturés est augmentée. Le rapport acides gras polyéthyléniques/acides gras monoéthyléniques est de 0,65 $\pm$ 0,05 à l'inverse de celui des lipoprotéines de sérum normal (1,4 $\pm$ 0,06).

	SERUM DE CHOLOSTASE		
	LPSC FRACTION II	β-LIPOPROTEINES FRACTION III	HDL
C 10	-	-	-
C 12	-	-	-
C 14	0,9 (0,7 - 1,3)	0,8 (0,6 - 1,0)	0,9 (0,8 - 1,0)
C 15	0,3 (0 - 0,6)	0,13 (0 - 0,4)	0,3 (0 - 0,6)
C 16 : 0	38,2 (21,5 - 40,6)	34,0 (22,7 - 44,2)	34,2 (32,4 - 35,9)
C 16 : 1	4,2 (2,8 - 5,4)	4,5 (4,0 - 5,4)	3,3 (2,4 - 4,2)
C 17 : 0	0,1 (0 - 0,3)	-	-
C 16 : 2	0,3 (0 - 0,8)	-	-
C 18 : 0	13,5 (7,9 - 21,0)	11,0 (6,7 - 14,9)	9,8 (7,6 - 11,75)
C 18 : 1	26,7 (23,7 - 30,7)	31,5 (25,8 - 35,8)	20,7 (20,0 - 21,5)
C 18 : 2	17,7 (14,7 - 20,3)	16,9 (14,3 - 21,1)	15,7 (12,4 - 19,0)
C 18 : 3	0,3 (0 - 1,0)	-	0,5 (0 - 1,0)
C 20 : 3	0,7 (0 - 1,6)	-	2,3 (1,5 - 3,0)
C 20 : 4	2,5 (1,0 - 3,6)	1,35 (0 - 4,0)	6,2 (5,2 - 7,1)

TABLEAU X_A

Composition en acides gras des phospholipides des lipoprotéines de sérum de cholostase.

Les valeurs sont exprimées en pourcentage des esters méthyliques totaux d'acides gras.

	SERUM NORMAL			
	CHYLOMICRONS	VLDL	LDL	HDL
C 10	0,7	-	-	-
C 12	1,8	0,9	0,3 (0 - 0,6)	0,7
C 14	9,4	3,1	0,85 (0,8 - 0,9)	0,55 (0,5 - 0,6)
C 15	1,4	0,5	0,2 (0 - 0,4)	0,4 (0,4 - 0,4)
C 16:0	36,1	28,4	31,2 (27,7 - 34,7)	30,8 (24,9 - 36,6)
C 16:1	2,2	2,4	2,6 (2,1 - 3,2)	1,3 (0,7 - 1,8)
C 17:0	-	0,5	0,3 (0 - 0,6)	0,25 (0 - 0,5)
C 16:2	-	1,2	-	-
C 18:0	17,2	12,8	13,6 (12,1 - 15,1)	11,2 (10,4 - 11,9)
C 18:1	24,5	23,6	17,8 (15,7 - 20)	16,9 (15,5 - 18,4)
C 18:2	5,7	20,3	23,6 (21,5 - 25,6)	23,4 (21,2 - 25,6)
C 18:3	-	-	0,55 (0 - 1,1)	0,65 (0 - 1,3)
C 20:3	-	-	1,6 (1,3 - 3,0)	2,4 (2,2 - 2,7)
C 20:4	-	6,3	7,1 (6,6 - 7,5)	10,1 (9,8 - 10,8)

TABLEAU X B

Composition en acides gras des phospholipides des lipoprotéines de sérum normal.

Les valeurs sont exprimées en pourcentage des esters méthyliques totaux d'acides gras.

	BILE	
	HEPATIQUE	VESICULAIRE
C 10	-	-
C 12	0,8 (0,6 - 1,0)	-
C 14	0,78 (0,7 - 0,85)	0,2 (0,05 - 0,4)
C 15	0,55 (0,5 - 0,6)	0,15 (0,05 - 0,4)
C 16 : 0	41,4 (40,7 - 42,2)	41,2 (37,4 - 45,0)
C 16 : 1	4,0 (3,9 - 4,2)	3,7 (2,9 - 4,5)
C 17 : 0	0,4 (0 - 0,9)	-
C 16 : 2	-	-
C 18 : 0	8,6 (8,5 - 8,7)	7,0 (6,3 - 7,8)
C 18 : 1	23,6 (22,9 - 24,2)	19,0 (18,7 - 19,2)
C 18 : 2	13,1 (10,9 - 15,3)	23,0 (21,4 - 24,5)
C 18 : 3	0,5 (0 - 0,9)	-
C 20 : 3	0,3 (0 - 0,7)	-
C 20 : 4	4,5 (4,37 - 4,6)	-

TABLEAU X_C

Composition en acides gras des phospholipides de bile hépatique et vésiculaire.

Les valeurs sont exprimées en pourcentage des esters méthyliques totaux d'acides gras.

Ces anomalies se retrouvent dans les phospholipides des β-lipoprotéines (fraction III). Dans les phospholipides des HDL sériques de cholostase, l'inversion du rapport acides gras polyéniques/acides gras monoéniques s'observe inconstamment. Ces lipoprotéines, chez le sujet normal et en dehors de toute obstruction biliaire, représentent la forme de transport habituel des phospholipides sériques. En raison de l'importance de la fraction "phospholipides" des lipoprotéines sériques des sujets atteints d'obstruction biliaire, la distribution des acides gras des lipides totaux montre les mêmes caractéristiques.*

D'autre part, l'analyse de la distribution des acides gras dans les phospholipides de la bile hépatique révèle une répartition similaire à celle observée dans les phospholipides des lipoprotéines de cholostase avec une diminution des acides gras polyéthyléniques et le même rapport acides gras polyéthyléniques/acides gras monoéthyléniques voisin de 0,6. Par contre, ces proportions ne sont pas retrouvées dans les phospholipides de la bile vésiculaire où ce rapport est supérieur à l'unité (tableaux $X_{A, B, C}$ et XI). Ces résultats confirment les différences significatives dans la composition en acides gras de la bile hépatique et de la bile vésiculaire observées par Berg (25) et Blomstrand (26).

* Il a été observé d'autre part que les anomalies de répartition des acides gras des phospholipides des lipoprotéines sériques ne se retrouvaient pas dans les tissus; c'est ainsi que l'analyse des acides gras des lipides de la peau a montré pour ce tissu la répartition habituelle en acides gras saturés et insaturés.

L'analogie de distribution des acides gras des phospholipides de bile hépatique et des lipoprotéines sériques d'obstruction biliaire est en faveur de l'origine biliaire des phospholipides de ces lipoprotéines. Les travaux de Balint et collaborateurs ont bien établi l'hétérogénéité des phospholipides hépatiques et montré les différences significatives de répartition des acides gras entre les phospholipides hépatiques excrétés dans la bile et ceux déversés dans le plasma.

	ACIDES GRAS		
	SATURES 16 : 0 18 : 0	MONOETHYLENIQUES 16 : 1 18 : 1	POLYETHYLENIQUES 18 : 2 20 : 4
VLDL	41,2	26,0	26,6
HDL	41,8	18,2	33,7
LDL	42,8	22,1	32,1
CHYLOMICRONS	53,1	26,7	5,7
LPSC	46,3	30,9	20,2
β-LIPOPROTEINES (Fraction III)	45,0	36,0	19,6
BILE (HEPATIQUE)	50,0	27,5	17,6
BILE (VESICULAIRE)	48,2	22,7	29,0

TABLEAU XI

mposition en acides gras des phospholipides de la bile et des lipoprotéines sériques normales et d'obstruction biliaire.

s valeurs sont exprimées en pourcentage des esters méthyliques totaux d'acides gras.

IX OBSTRUCTION BILIAIRE EXPERIMENTALE

Puisque ces anomalies des lipoprotéines sériques sont décelées au cours de l'obstruction biliaire, nous avons recherché si la ligature des voies biliaires chez l'animal entraîne l'apparition de lipoprotéines anormales comme nous l'avons observé chez l'homme.

L'étude expérimentale a été effectuée sur le sérum de chien dont les voies biliaires ont été ligaturées comme nous l'avons décrit dans la Première Partie, chapitre I. Les résultats obtenus ont été confrontés avec ceux donnés par l'analyse du sérum de chien normal.

La pratique systématique de la réaction de Jirgl sur chaque prélèvement de sérum nous a aidé pour déceler la présence dans le sang des lipoprotéines anormales car, comme nous l'avons vu précédemment, elles sont responsables de la floculation de cette réaction.

A - ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES LIPOPROTEINES SERIQUES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE EXPERIMENTALE.

En présence d'un immunsérum anti-LDL de sérum de chien atteint de cholostase (anti-LPC), l'examen immunoélectrophorétique des lipoprotéines légères (LPC) du sérum de chien, prélevé le 10e jour après la ligature totale des voies biliaires, montre les constituants suivants (Fig. 13 - B).

A : [illegible]

1 : sérum normal ; 2 : [illegible]

Immunsérum : anti-lipoprotéines légères de sérum de chien atteints de cholostase (anti-LPC).

B : Immunoélectrophorèse de lipoprotéines légères de sérum de chien atteint de cholostase ; LPC.

Immunsérum : anti-LPC.

1/ des α-lipoprotéines rapides ;

2/ des β-lipoprotéines lentes ;

3/ des lipoprotéines lentes, de même mobilité que les β-lipoprotéines mais possédant un site antigénique identique aux α-lipoprotéines ; l'arc de précipitation de ces lipoprotéines rejoint en effet celui des α-lipoprotéines rapides.

4/ Enfin, très près de ces β-lipoprotéines lentes s'observe une ligne de précipitation simple ou double. Cette ligne de précipitation est distincte de celle des β- et α-lipoprotéines. Elle n'apparaît pas lorsque les LPC sont étudiées en présence d'immunsérums anti-protéines totales ou anti-lipoprotéines de sérum de chien normal. Seul, les arcs de précipitation caractéristiques des β-lipoprotéines et des α-lipoprotéines sont mis en évidence.

De même, cette ligne de précipitation n'est pas observée lorsque les LDL de chien normal sont étudiées en présence de sérum anti-LPC.

L'examen immunoélectrophorétique du sérum de chien en cholostase confirme ces résultats en révélant, en présence de sérum anti-LPC, des β-lipoprotéines, des α-lipoprotéines et des lipoprotéines observées exclusivement dans le sérum de chien atteint d'obstruction biliaire. L'arc de précipitation particulier de ces lipoprotéines anormales est en effet absent du sérum de chien normal (fig. 13-A).

Ainsi, le sérum de chien dont les voies biliaires ont été totalement ligaturées renferme-t-il des lipoprotéines anormales dont la présence ne peut être décelée dans le sérum de chien normal. Tous les

prélèvements de sérum effectués sur les chiens entre le 9e et le 14e jour après l'intervention, ont montré la présence de lipoprotéines anormales. Toutefois, celles-ci apparaissent en quantité plus importante dans le sérum le 11e et le 12e jour après la ligature totale des voies biliaires. L'intensité de la réaction de Jirgl montre une évolution analogue. Le floculat qui caractérise cette réaction est plus intense vers le 11e jour ou le 12e jour après l'intervention.

B - ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES SERIQUES ANORMALES DANS L'OBSTRUCTION BILIAIRE EXPERIMENTALE.

1 - Précipitation par l'héparine :

Comme nous l'avons vu précédemment, l'héparine en présence d'ions Ca^{++} précipite les β -lipoprotéines et également les lipoprotéines anormales. Après redissolution du précipité, le test de Jirgl, fortement positif, permet de déceler les lipoprotéines anormales. Aucun floculat ne s'observe avec les LDL de sérum de chien normal, utilisées à la place des LPC. Mais, cette méthode ne permet pas d'obtenir des lipoprotéines anormales pures, aussi nous avons tenté de les isoler par gel filtration.

2 - Isolement par gel filtration :

Les lipoprotéines sériques anormales sont fractionnées par gel filtration sur colonne de Séphadex G-200, soit à partir de sérum entier, soit à partir de la fraction LPC. D'autres fractionnements sont

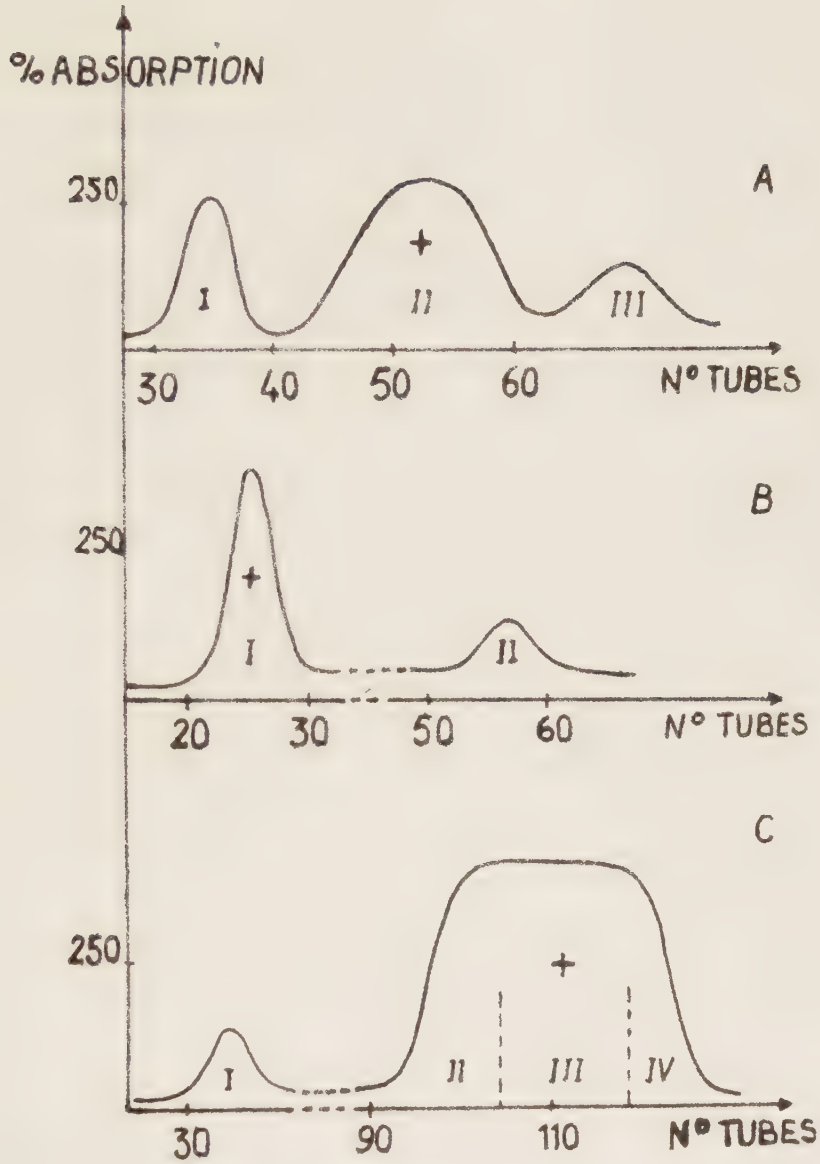
effectués sur l'extrait sulfosalicylique du sérum (les lipoprotéines anormales étant sulfosalicylo-solubles comme nous l'indique la réaction de Jirgl).

Les graphiques représentés dans la figure 14 montrent les diagrammes d'élution des protéines sériques (fig. 14-A), des lipoprotéines de la fraction LPC (fig. 14-B) ou de l'extrait sulfosalicylique de sérum (fig. 14-C) sur colonne de Séphadex G-200.

La présence de lipoprotéines anormales est observée dans la fraction II au cours du fractionnement des protéines sériques (fig. 14-A), dans la fraction principale obtenue par élution des LPC (fig. 14-B), et dans la troisième fraction éluée par gel filtration de l'extrait sulfosalicylique du sérum (fig. 14-C). Seules ces fractions donnent la réaction de floculation de Jirgl.

Au cours de la cholostase expérimentale se produisent des modifications des lipoprotéines sériques comparables à celles observées dans la cholostase humaine.

Les α-lipoprotéines sont en diminution et l'on trouve des α-lipoprotéines mêlées aux β-lipoprotéines dans la fraction lipoprotéines légères du sérum de ces chiens. Ces LPC, anormalement riches en phospholipides, renferment des lipoprotéines anormales qui ne réagissent pas avec un immunsérum anti-protéines sériques de chien normal, mais précipitent exclusivement avec un immunsérum anti-LPC. Ces lipoprotéines sont donc absentes du sérum de chien normal. Elles sont très riches en phospholipides et, à la différence des α-lipoprotéines, précipitent par l'héparine. Seules ces lipoprotéines anormales provoquent la réaction de floculation de Jirgl.



Séparation par gel filtration de lipoprotéines anormales du sérum de chien atteint de cholostase.

A : fractionnement du [illegible]

B : fractionnement de [illegible]

C : fractionnement de l'extrait sulfosa[illegible]

Ainsi est-il possible de mettre en évidence dans la cholostase expérimentale comme dans la cholostase humaine des lipoprotéines anormales.

Les lipoprotéines anormales sont toujours mises en évidence dans le sérum de chien entre dix et douze jours après la ligature totale des voies biliaires. La ligature partielle des voies biliaires est insuffisante pour provoquer l'apparition de ces lipoprotéines anormales (28).

L'observation de lipoprotéines anormales dans la cholostase expérimentale prouve le rôle de l'obstruction biliaire dans l'apparition de ces lipoprotéines déjà décelées dans la cholostase humaine.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION

Cette étude indique qu'au cours de l'obstruction biliaire, les lipoprotéines légères du sérum (LPC) présentent diverses anomalies et renferment des constituants anormaux.

La présence de lipoprotéines sériques anormales spécifiques de la cholostase, LPSC, a pu être décelée par des méthodes immunochimiques. Ces lipoprotéines, LPSC, précipitent exclusivement avec un anti-sérum de lapin préparé par administration à l'animal de lipoprotéines sériques légères obtenues au cours de l'obstruction biliaire (immunsérum anti-LPC). Ces lipoprotéines anormales, LPSC, sont absentes du sérum normal.

Nous avons mis en évidence et caractérisé ces lipoprotéines anormales. Après élimination des constituants normaux de la fraction LPC par les immunsérums anti- β -lipoprotéines, anti- α lipoprotéines et anti-protéines sériques normales, l'addition d'immunsérum spécifique anti-LPC ou d'héparine en présence d'ions Ca^{++} entraîne un nouveau précipité. Ce précipité n'apparaît pas avec des lipoprotéines légères de sérum normal traitées de façon identique.

En outre, la présence d'anticorps spécifiques anti-LPSC a pu être caractérisée dans l'immunsérum anti-LPC après épuisement de celui-ci par les constituants protéiques normaux du sérum. L'immunsérum ainsi épuisé est spécifique des LPSC et ne réagit pas avec les lipoprotéines et protéines normales.

Les lipoprotéines anormales peuvent en outre être isolées par gel filtration sur Bio-gel A-50 M. Cette méthode de fractionnement originale permet de séparer aisément les lipoprotéines anormales, et présente aussi l'avantage d'être un procédé moins brutal que la méthode de préparation réalisée par Seidel et Alaupovic (28). Celle-ci est basée sur la précipitation des lipoprotéines anormales par l'éthanol. En effet, cette technique présente différents inconvénients. Elle ne permet pas d'écarter totalement la présence d'autres lipoprotéines ou protéines contaminantes tandis que le fractionnement par gel filtration sépare des fractions pures, vérifiées immunologiquement. De plus, la séparation par l'éthanol utilisée par Seidel et Alaupovic n'écarte pas la possibilité d'associations moléculaires anormales au cours de la précipitation. On peut pénser alors que les différentes fractions de lipoprotéines anormales d'obstruction biliaire obtenues par Seidel aient contenu, suivant les préparations, des proportions variables mais toujours élevées d'albumine (40 à 60 %) (21), et sans doute est-ce la raison pour laquelle Seidel a considéré la lipoprotéine anormale d'obstruction biliaire comme une association entre une lipoprotéine particulière (LP-X) et l'albumine du sérum. Notre méthode de fractionnement par gel filtration ne présente pas cet inconvénient car l'albumine contaminante n'est pas exclue du gel d'agarose.

La composition chimique des LPSC révèle une forte teneur en phospholipides comme celle des HDL. Mais leur constante de flottation est semblable à celle des LDL. Comme ces dernières et les VLDL, elles

précipitent par l'héparine en présence de cations bivalents. Leur antigénicité particulière peut s'expliquer par une altération des lipoprotéines ou de protéines sériques normales, ou être due à un site antigénique normalement masqué dans les lipoprotéines natives.

Nous avons alors comparé les LPSC avec les lipoprotéines natives ou délipidées de sérum normal. Aucune communauté antigénique n'apparaît entre les LPSC et les β - et α-lipoprotéines normales. De même, nous avons vu que ces lipoprotéines anormales sont immunologiquement distinctes des VLDL, des chylomicrons et des autres protéines sériques, et en particulier de l'albumine.

Toutefois, les résultats sont différents lorsque les lipoprotéines anormales, isolées par gel filtration, sont délipidées par l'éther. Les lipoprotéines anormales délipidées réagissent avec un sérum anti-albumine en donnant un arc de précipitation distinct de celui obtenu avec l'immunsérum anti-LPC. L'albumine n'est cependant présente qu'en faible quantité, 15 % environ de la protéine totale des lipoprotéines anormales. Des résultats différents ont été donnés par Seidel et Alaupovic. Pour ces auteurs, la lipoprotéine anormale d'obstruction biliaire serait constituée dans sa partie protéique pour 40 à 60 % par l'albumine et pour le reste seulement par une apolipoprotéine particulière. Ces auteurs recourent, pour isoler leur lipoprotéine, à une précipitation éthanolique globale sans faire appel à un fractionnement sélectif comme cela est effectué dans notre méthode.

Quant à l'apolipoprotéine distincte de l'albumine, elle est isolée par une nouvelle extraction aqueuse de la phase éthérée obtenue au cours de la délipidation. Cette apolipoprotéine donne un arc de précipitation double en présence de l'immunsérum spécifique.

La composition chimique de cette apolipoprotéine fait apparaître une composition en acides aminés très proche de celle des apolipopeptides caractéristiques des VLDL. On retrouve la même richesse en sérine, leucine, lysine et alanine et on note également l'absence d'acides aminés soufrés. Précisemment, l'examen immunologique de cette apolipoprotéine montre une communauté antigénique avec les VLDL délipidées en présence d'immunsérum anti-VLDL délipidées.

En accord avec ces résultats, l'apolipoprotéine particulière des LPSC apparaît être essentiellement constituée par les apolipopeptides caractéristiques des VLDL (Apo C)(21-23).

L'examen immunologique de cette apolipoprotéine avec l'antisérum spécifique semble toutefois indiquer la présence de deux déterminants antigéniques distincts. Des observations effectuées sur certaines préparations ont pu montrer la communauté antigénique de l'un de ces déterminants avec les α-lipoprotéines. Cette constatation semblerait indiquer aussi la présence d'apolipopeptides A dans ces lipoprotéines anormales.

La nécessité de délipider ces lipoprotéines anormales pour y révéler des sites antigéniques communs avec les lipoprotéines normales s'explique vraissemblablement par la présence, dans le sérum au cours

de l'obstruction biliaire, de lipides anormaux ou d'autres facteurs qui masquent les sites antigéniques usuels.

La présence de lipoprotéines anormales dans la cholostase expérimentale après ligature totale des voies biliaires prouve le rôle de l'obstruction biliaire dans l'apparition de ces lipoprotéines. L'examen immunologique de celles-ci a également montré leur complexité et la présence dans leurs constituants d'un déterminant antigénique commun avec les α-lipoprotéines. Le délai d'apparition chez le chien de ces lipoprotéines sériques anormales est de 10 à 12 jours.

L'observation de ces lipoprotéines anormales est toujours liée à l'obstruction biliaire totale, que celle-ci soit d'origine extra- ou intra-hépatique. Ces constatations suggèrent un reflux des constituants biliaires vers le plasma. Ainsi, par suite de l'obstruction des voies biliaires, les phospholipides ne peuvent être éliminés normalement dans la bile ; leur concentration s'accroît dans le plasma d'où la présence de substances inhabituelles véhiculant ces phospholipides.

Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le mécanisme de production de ces lipoprotéines anormales.

L'augmentation des sels biliaires dans le sérum modifie le comportement électrophorétique des β-lipoprotéines (29). On pourrait rechercher, en présence des sels biliaires, un mécanisme possible dans l'apparition des lipoprotéines anormales. Toutefois, comme nous l'avons constaté in vitro, les sels biliaires ne modifient pas les propriétés immunochimiques des lipoprotéines du sérum normal et d'obstruction biliaire (3). L'absence d'effet, in vitro, n'écarte pas l'éventualité

d'une action, in vivo, sur la biosynthèse des lipoprotéines hépatiques. La vérification d'une telle hypothèse est difficile car elle nécessite de recourir à une hypercholalémie expérimentale prolongée sans obstruction biliaire.

Nous avons observé d'autre part, une diminution du rapport acides gras polyéthyléniques/acides gras monoéthyléniques des phospholipides des lipoprotéines anormales LPSC et de la bile hépatique. Or, nous savons que le pool des lécithines du foie est très hétérogène ; les lécithines hépatiques excrétées dans la bile ont une composition différente de celles observées dans la plasma (26). Cette analogie de répartition des acides gras des phospholipides de bile hépatique et des lipoprotéines sériques dans l'obstruction biliaire est en faveur du passage dans le sérum des phospholipides hépatiques normalement excrétés dans la bile.

L'apparition des lipoprotéines anormales serait liée au passage dans le sang des phospholipides de la bile hépatique. De nombreux travaux ont bien établi la constitution différente des phospholipides hépatiques en relation avec leur métabolisme.

La présence anormale dans le sérum de phospholipides biliaires associés à des apolipopeptides présents dans certaines lipoprotéines normales permet d'expliquer le masquage des sites antigéniques habituels et l'absence de réponse aux immunsérums normaux. De telles associations constitueraient les "lipoprotéines anormales".

QUATRIEME PARTIE

CONCLUSIONS

Au cours de l'obstruction biliaire apparaissent dans le sérum, des lipoprotéines légères d'un type inhabituel. Ces lipoprotéines ont été mises en évidence par immunodiffusion en gel d'agarose contre un immunsérum spécifique préparé au laboratoire. Ces lipoprotéines ne réagissent pas avec les sérums anti-lipoprotéines ou anti-protéines totales de sujets normaux. Elles sont absentes du sérum normal.

Après précipitation de ces lipoprotéines anormales par l'immunsérum spécifique, le complexe antigène-anticorps est dissocié. L'anticorps ainsi isolé réagit exclusivement avec ces lipoprotéines anormales.

La séparation des lipoprotéines anormales des autres lipoprotéines contenues dans la fraction LDL du sérum au cours de l'obstruction biliaire a été réalisée par gel filtration. Par cette méthode, les lipoprotéines anormales sont aisément séparées des autres lipoprotéines sériques contaminantes et se montrent immunologiquement pures. Elles réagissent exclusivement avec l'immunsérum spécifique.

Ces lipoprotéines sont très riches en phospholipides (60 %) et la partie peptidique représente seulement 1,5 % de la masse micellaire totale.

Après délipidation par l'éther, de nouveaux sites antigéniques de ces lipoprotéines anormales sont démasqués. En particulier, de l'al-

bumine est isolée de ces lipoprotéines au cours de l'extraction éthérée. Mais elle représente seulement 15 % environ de la protéine totale.

L'apolipoprotéine particulière, isolée après délipidation, possède des propriétés immunologiques propres aux VLDL délipidées. Sa composition en acides aminés et ses caractères antigéniques révèlent la présence de lipopeptides caractéristiques des VLDL (apolipopeptide C).

La ligature des voies biliaires chez le chien provoque aussi l'apparition de lipoprotéines particulières qui ne peuvent être mises en évidence dans le sérum de chien normal. Ces lipoprotéines possèdent un déterminant antigénique commun avec les α-lipoprotéines. Ainsi l'obstacle à l'écoulement de la bile est-il fondamental pour qu'apparaissent dans le sérum ces lipoprotéines anormales.

L'analyse de la composition en acides gras de ces lipoprotéines reflète les conséquences de l'obstruction biliaire. Les phospholipides des lipoprotéines anormales et de la bile hépatique possèdent un rapport acides gras poly-insaturés/acides gras mono-insaturés identique. Ce rapport est très différent de celui observé dans les phospholipides des lipoprotéines du sérum normal et de la bile vésiculaire.

Ainsi, bien que le site cellulaire de leur production reste à préciser, l'apparition de ces lipoprotéines anormales dans le sang serait liée à la diffusion, hors de l'hépatocyte, des phospholipides particuliers, normalement drainés par la bile et qui, en raison du blocage du pôle biliaire de la cellule hépatique, refluereient vers le plasma.

B I B L I O G R A P H I E

1 - RUSS E.M., RAYMUNT J., BARR D.P., J. Clin. Invest. 35 (1956) 133.

2 - PICARD J., SAMAIR P., Clin. Chim. Acta 13 (1966) 514-517.

3 - PICARD J., VEISSIERE D., Revue des CHU 2 (1968) 30.

4 - BURSTEIN M., CAROLI J., Revue Franç. Etudes Clin. Biol. 13 (1968) 404.

5 - PICARD J., VEISSIERE D., HOUSSET E., LEMAIRE A., Pathol. Biol. 14 (1966) 641.

6 - HAVEL R.J., EDER H.A., BRAGDON J.H., J. Clin. Invest. 34 (1955) 1345.

7 - GRABAR P., WILLIAMS C.A., Biochim. Biophys. Acta 10 (1953) 193 et 17 (1955) 65.

8 - GRABAR P., BURTIN P., Immunoelectrophoresis Analysis - Elsevier, Amsterdam (1964) 3.

9 - AUGUSTIN R., HAYWARD B., Immunology 4 (1961) 450.

10 - LOWRY, ROSENBROUG N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., J. Biol. Chem. 195 (1952) 357.

11 - KABAT A., MAYERS M.M., Experimental Immunochemistry - Charles Thomas, Springfield (1964) 22.

12 - BURSTEIN M., SAMAILLE J., Ann. Biol. Clin. 17 (1959) 23.

13 - FOLCH PI, J. Exptl. Ann. Biochem. Med. 21 (1959) 81.

14 - DELSAL J.L., MANHOUN H., Bull. Soc. Chim. Biol. 37 (1955) 1041.

15 - VAN HANDEL E., ZIWERSMIT D.B., J. Lab. Clin. Med. 50 (1957) 152.

16 - DELSAL J.L., Bull. Soc. Chim. Biol. 26 (1944) 99.

17 - VAN WIJNGAARDEN, An. Chem. 39 (1967) 7.

18 - FLODIN P., KILLANDER J., Biochim. Biophys. Acta 63 (1962) 403.

19 - KALAB M., MARTIN W.G., J. of Chromatog. 35 (1968) 230.

20 - SWITZER S., J. Clin. Invest. 46 (1967) 1855.

21 - ALAUPOVIC P., SEIDEL D., Febs Letters 4 (1969) 113.

22 - LEVY R.S., FREDERICKSON D.S., J. Biol. Chem. 244 (1969) 5687.

23 - ALAUPOVIC P., SEIDEL D., Communication European Atherosclerosis Group Meeting, Octobre 1970.

24 - BERG G., TROLL U., Digestion 1 (1968) 337.

25 - BLOMSTRAND R., EXDAHL P., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104 (1960) 205.

26 - BALINT J., J. of Lip. Res. 8 (1967) 486.

27 - PICARD J., VEISSIERE D., Pathol. Biol. 18 (1970) 839.

28 - ALAUPOVIC P., SEIDEL D., J. Clin. Invest. 48 (1969) 1211.

29 - FAUVERT, INFANTE, Communications personnelles.

TABLE DES MATIERES